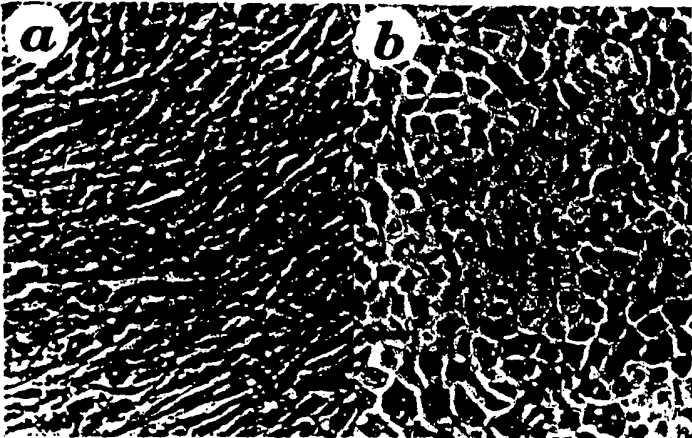




(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C12P 21/02, C12N 5/08, C07K 14/47, 16/18	A1	(11) 国際公開番号 WO99/02677 (43) 国際公開日 1999年1月21日(21.01.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03106 (22) 国際出願日 1998年7月10日(10.07.98) (30) 優先権データ 特願平9/202227 1997年7月11日(11.07.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 加藤幸夫(KATO, Yukio)[JP/JP] 〒732-0062 広島県広島市東区牛田早稲田三丁目6-9-501 Hiroshima, (JP) 河本 健(KAWAMOTO, Takeshi)[JP/JP] 〒754-1200 山口県吉敷郡阿知須町2580番地17 Yamaguchi, (JP) (74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開; 補正書受領の際には再公開される。
(54)Title: GENE ORIGINATING IN HUMAN CHONDROCYTE (54)発明の名称 ヒト軟骨細胞由来遺伝子 (57) Abstract A gene expressed specifically in differentiated chondrocytes originating in humans. This gene is obtained by culturing chondrocytes in the presence of dibutyryl cAMP so as to culture the same in a differentiated state, and detecting a gene showing a difference in expression between the differentiated chondrocytes and the dedifferentiated ones. 		

(57)要約

本発明は、分化したヒト由来軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子を提供するものであり、ジブチリルcAMPの存在下で軟骨細胞を培養することにより、軟骨細胞を分化状態で培養し、分化した軟骨細胞と脱分化した軟骨細胞との間で発現に差異のある遺伝子の探索を行うことにより、前者に特異的に発現している遺伝子を取得するものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	JP	日本	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KR	韓国	SD	スーダン		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン				

明細書

ヒト軟骨細胞由来遺伝子

技術分野

- 5 本発明は、分化したヒト由来軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子、該遺伝子がコードするタンパク質、及び、該タンパク質に結合し得る抗体、並びに、ヒト由来軟骨細胞を分化状態で培養する方法、及び、該方法で培養されたヒト由来軟骨細胞に関するものである。

10 背景技術

分化状態にある軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子の探索及び該軟骨細胞の性質の解析は、軟骨の分化や変性のメカニズムを解析する上で重要であるばかりでなく、変形性関節症や慢性関節リウマチなどに対する遺伝子治療の開発にとっても不可欠である。

- 15 しかし、ウサギやニワトリの軟骨細胞を分化状態で培養する系は確立しているが (Kato et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9552-9556; Oakes et al. (1977) J. Embryol. Exp. Morphol. 38, 239-263)、ヒトの軟骨細胞を分化状態で単層培養する方法は確立されていない。ヒトの軟骨細胞は、アガロースゲル中で分化表現型を維持することが知られているが (Benya P.D. and Shaffer J.D.,
20 Cell 30, 215-224, (1982))、細胞の取り扱いが容易な単層培養では、容易に分化表現型を失う。従って、ヒトにおける分化状態にある軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子の探索は困難であり、また、分化状態にある軟骨細胞の性質の解析に有用な培養細胞系は提供されていない。

25 発明の開示

本発明は、ヒト由来の軟骨細胞を分化状態で単層培養する方法を確立し、さら

に、分化状態にある軟骨細胞に特異的に発現している遺伝子を取得することを主たる目的とする。

5 本発明者らは、特定の化合物の存在下で軟骨細胞を培養することにより、軟骨細胞を分化状態で培養できることを見出すとともに、分化した軟骨細胞と脱分化した軟骨細胞との間で発現に差異のある遺伝子の探索を行い、前者に特異的に発現している遺伝子を見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする DNA (以下、本発明 DNA ともいう) を提供する。

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質

10 (b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、配列番号 2 におけるアミノ酸番号 51 ~ 108 のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号 2 におけるアミノ酸番号 51 ~ 108 のアミノ酸配列と 85 % 以上の相同性を有し、2 量体を形成したときに塩基配列 CANN TG 及び / 又は CACN AG に結合できるタンパク質。

15

本発明 DNA は、好ましくは、以下の (c) 又は (d) の DNA である。

(c) 配列番号 1 に示す塩基配列における塩基番号 207 ~ 1442 の塩基配列若しくはその相補塩基配列からなる DNA

(d) (c) の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

20 本発明は、また、本発明 DNA がコードするタンパク質及び該タンパク質に結合し得る抗体を提供する。

さらに、本発明は、軟骨細胞が軟骨としての分化状態を維持するのに十分な量の膜透過性 cAMP 類似体の存在下で軟骨細胞を単層培養することの特徴とするヒト由来の軟骨細胞の培養方法 (以下、本発明培養方法ともいう) を提供する。

25 膜透過性 cAMP 類似体は好ましくはジブチリル cAMP (以下 dbcAMP とも記載する) である。

また、さらに、本発明は、本発明培養方法によって培養された、以下（１）～（３）の性質を有するヒト由来の軟骨細胞を提供する。

- （１）球形を呈し、細胞外基質に富む
- （２）トルイジンブルーで良好に染色される
- （３）本発明DNAが発現している。

本発明DNAは、塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス（bHLH、basic helix-loop-helix）型新規転写制御因子をコードすると考えられ、軟骨としての分化において種々の遺伝子の発現を調節するなどの重要な役割を果たしていると予想される。従って、本発明DNA、該DNAがコードするタンパク質、及び、
10 該タンパク質に結合し得る抗体は、軟骨の分化や変性のメカニズムの解析において、そして、さらに、変形性関節症や慢性関節リウマチなどに対する遺伝子治療の開発においても有用である。

本発明培養方法によれば、軟骨細胞を良好な分化状態で単層培養でき、分化状態の軟骨細胞と脱分化状態の軟骨細胞との間で発現の差異を有する遺伝子を検
15 索すること、すなわち、分化状態の軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子を探索することが容易になる。また、分化状態における軟骨細胞の性質の解析も容易になる。

図面の簡単な説明

20 第１図は、DEC1と他のbHLHタンパク質のbHLH領域の比較を示す図である。

第２Ａ図は、単層培養したヒト軟骨細胞の形態を示す顕微鏡写真である（a：dbcAMP非添加、b：dbcAMP添加）。

第２Ｂ図は、単層培養したヒト軟骨細胞であって、トルイジンブルーにより染色
25 された細胞の形態（生物の形態）を示す写真である（a：dbcAMP非添加、b：dbcAMP添加）。

第3図は、ヒト肺由来腺維芽細胞株MRC5において、dbcAMPの添加後、DEC1 mRNAが誘導されたことを示す図である。

第4図は、ヒト子宮癌由来 Hela 細胞において、dbcAMPの添加後、DEC1 mRNAが誘導されたことを示す図である。

5 第5図は、ウサギ軟骨細胞において、PTHの添加後、EC1 mRNAが誘導されたことを示す図である。

第6図は、ウサギ軟骨細胞培養系において、dbcAMPの添加後、DEC1 mRNAが誘導されたことを示す図である。

10 第7図は、腎臓由来細胞株において、dbcAMPの添加、DEC1 mRNAが誘導されたことを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態を説明する。

15 配列番号2に示すアミノ酸配列は、後記実施例に示すように分化状態の軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子を探索した結果、初めて明らかになったものであり、このアミノ酸配列を有するタンパク質を、本明細書においては、DEC1とも呼ぶ。

20 タンパク質データベースを用いた相同性検索により、DEC1には、塩基性ヘリックスループヘリックス (bHLH) 領域があることが判明した (配列番号2におけるアミノ酸番号51~108)。bHLHタンパク質は、2量体を形成し、Eボックス (CANNTG) に結合することが知られている。

25 このbHLH領域では、特に、ラットHES1 (47.5%)、HES2 (42.6%)、HES3 (40.3%)、HES5 (37.7%)、ドロソフィラヘアリイ (Drosophila hairy) [hairy と略す] (39.3%)、及び、エンハンサーオブスプリット (Enhancer of split) m7 [E(spl) m7 と略す] (37.7%) と高い相同性を示した (括弧内の数値は相同性の値である)。図1に、それぞれの

対応する b H L H 領域を比較して示す。保存されている残基は枠で囲われている。

H E S ファミリー、hairy 及び E(spl) m7 は、Nボックス (C A C N A G) に結合することにより転写を抑制する負の制御因子として機能し (Sasai et al. (1992) Genes & Dev. 6, 2620-2634; Ishibashi et al. (1993) Eur. J. Biochem. 215, 645-652; Akazawa et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 21879-21885; Ohsako et al. (1994) Genes & Dev. 8, 2743-2755; Dawson et al. (1995) Mol. Cell. Biol. 15, 6923-6931; Jan et al. (1993) Cell 75, 827-830)、また、コレプレッサーによるある種のアクティベータの抑制を導くと考えられる Trp-Arg-Pro-Trp(WRPW) (配列番号 3) 領域を C 末端側に有している (Dawson et al. (1995) Mol. Cell. Biol. 15, 6923-6931)。D E C 1 は b H L H タンパク質と類似するが、この WRPW 領域を有さないので、D E C 1 は軟骨形成に関与する新規な転写因子であると思われる。以上のことから、D E C 1 は E ボックスに加え N ボックスにも結合できるものと考えられる。

従って、本発明 DNA は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA だけでなく、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、配列番号 2 におけるアミノ酸番号 51~108 のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号 2 におけるアミノ酸番号 51~108 のアミノ酸配列と 85% 以上、好ましくは 90% 以上の相同性を有し、2 量体を形成したときに塩基配列 C A N N T G 及び/又は C A C N A G、好ましくは塩基配列 C A N N T G に結合できるタンパク質をコードする DNA も包含するものである。ここで上記塩基配列中の N は A、G、C 又は T を示す。塩基配列 C A N N T G の例としては、C A C G T G、C A G G T G、C A G T T G 及び C A C C T G が挙げられる。なお、「タンパク質をコードする」とは、DNA が 2 本鎖である場合には、相補 2 本鎖のいずれか一方がタンパク質をコードする塩基配列を有することを意味する。

アミノ酸残基の置換、欠失又は挿入は、部位特異的突然変異などの公知の方法

によって塩基配列にヌクレオチドの置換、欠失、挿入などの変異を導入することによって生じさせることができる。2量体を形成したときに塩基配列 C A N N T G又はC A C N A Gに結合できる活性の測定方法は公知（例えば、Ohsako et al. (1994) Genes & Dev. 8, 2743-2755）であり、この活性を実質的に害さない1以上のアミノ酸残基の置換、欠失又は挿入を当業者は容易に選択することができる。

本発明DNAの具体例としては、以下の（c）及び（d）のDNAが挙げられる。

（c）配列番号1に示す塩基配列における塩基番号207～1442の塩基配列若しくはその相補塩基配列からなるDNA

10 （d）（c）のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

ここでストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高い核酸同士、例えば完全にマッチしたハイブリッドのT_mから該T_mより20℃低い温度までの範囲の温度、あるいは80%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸同士がハイブリダイズしない条件が挙げられる。

15

本発明DNAは、好ましくは配列番号2に示すアミノ酸配列をコードするものであり、さらに好ましくは上記（c）のDNAである。

本発明DNAは、本発明により後記実施例に示すようにその塩基配列の一つが決定されたので、この配列に基づいて合成することが可能である。また、この塩基配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブを用いたPCR又はハイブリダイゼーションによって染色体DNAから得ることもできる。あるいは、軟骨のmRNAを用いてRT-PCRを行うこと、軟骨などのcDNAライブラリーを、DEC1の全部又は一部をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングすることによっても得ることができる。

25

本発明DNAがコードするタンパク質は、以下の(e)又は(f)のタンパク質(以下、本発明タンパク質ともいう)である。

(e) 配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質

5 (f) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、配列番号2におけるアミノ酸番号51～108のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号2におけるアミノ酸番号51～108のアミノ酸配列と85%以上の相同性を有し、2量体を形成したときに塩基配列CANN TG及び/又はCACNAGに結合できるタンパク質。

10 本発明タンパク質は、公知の発現ベクターに本発明DNAを挿入して組換えプラスミドを構築し、この組換えプラスミドを導入して形質転換された細胞を得、形質転換された細胞を、好適な培地で培養し、本発明タンパク質を培養物中に生成蓄積させ、その培養物から該タンパク質を採取することによって製造することができる。

15 細胞及び発現ベクターとしては、外来タンパク質の発現に通常用いられる宿主ベクター系を使用することができ、例えば、大腸菌等の原核細胞とそれに適した発現ベクター、哺乳類細胞等の真核細胞とそれに適した発現ベクターの組み合わせが挙げられる。培地や培養条件は、用いる細胞に合わせて適宜選択される。

本発明タンパク質は、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させてもよい。また、本発明タンパク質は全長を発現させてもよいし、一部を部分ペプチドとして発現させてもよい。

20 培養物とは、培地および当該培地中の細胞であり、培養物からの本発明タンパク質の採取は、上記の本発明タンパク質の活性等を指標にして、公知のタンパク質の精製方法によって行うことができる。

25 本発明タンパク質に結合し得る抗体(以下、本発明抗体ともいう)は、本発明タンパク質を抗原として用いて、常法に従って作製することができる。本発明抗

体は、ポリクローナルでもモノクローナルでもよい。

本発明タンパク質は、そのまま抗原として用いてもよいが、キーホールリンベ
ットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミンなどのキャリアタンパ
ク質と結合させて、及び／又は、アジュバントを併用して抗原として用いること
が好ましい。

ポリクローナル抗体は、例えばマウス、ウサギ、モルモット、ヒツジ等の被免
疫動物を、上記抗原を皮下、腹腔内、静脈内注射等により投与することにより免
疫し、免疫した動物から血清を採取することによって得ることができる。

モノクローナル抗体は、例えば、以下のようにして得ることができる。マウス、
ウサギ、モルモット、ヒツジ等の被免疫動物を、上記抗原を皮下、腹腔内、静脈
内注射等により投与して免疫した後に脾臓やリンパ節を摘出し、これから採取し
た細胞と、好ましくは被免疫動物と同種の動物に由来するミエローマ細胞とを細
胞融合させてハイブリドーマを樹立し、得られたハイブリドーマから上記抗原に
対する特異的抗体を継続的に産生する細胞株を、スクリーニングとクローニング
を繰り返すことによって選択する。こうして選択された細胞株を好適な培地で培
養することによって、培地中にモノクローナル抗体を産生させる。あるいは、マ
ウスの腹腔内等の生体内で培養することにより腹水中等に産生させる。

得られたポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の精製法としては、硫酸
アンモニウムによる塩析、DEAEセルロースカラム等を用いるイオン交換クロ
マトグラフィー、プロテインAカラム等を用いるアフィニティクロマトグラフィー、
免疫吸着クロマトグラフィー等を挙げることができる。なお、本発明抗体は、
例えば、本発明タンパク質及び標識抗体を用いる免疫測定法等により検出するこ
とができる。

本発明抗体は、抗原結合部位（Fab）が保存されている限り、フラグメント
化されたものでもよい。フラグメント化された本抗体として具体的には、例えば
抗原結合部位を分解しないパパイン等のプロテアーゼで本抗体を分解して得られ

るFabを含むフラグメントが挙げられる。

本発明抗体は、標識物質と結合させることによって標識化されていてもよい。標識物質としては、タンパク質の標識に通常使用可能なものであれば、特に限定されず、酵素、アイソトープ、蛍光物質等が挙げられる。

- 5 次に、本発明培養方法について説明する。本発明方法は、軟骨細胞が軟骨としての分化状態を維持するのに十分な量の膜透過性cAMP類似体の存在下で軟骨細胞を単層培養することを特徴とする。

- 10 軟骨細胞の単層培養は、膜透過性cAMP類似体の存在下で行う他は、従来の軟骨細胞の単層培養と同様に行うことができる。例えば、培養に用いる培地としては、牛胎仔血清、アスコルビン酸、抗生物質等を適宜含む α 改変イーグル培地が挙げられる。

膜透過性cAMP類似体は、cAMPのいわゆる第2メッセンジャーとして機能を損なうことなく細胞膜を透過できる性質をもったcAMPの類似体であり、好ましくは、ジブチリルcAMPである。

- 15 膜透過性cAMP類似体の培地中の存在量は、軟骨細胞が軟骨としての分化状態を維持するのに十分な量であればよく、例えば、ジブチリルcAMPの場合には0.3～0.5mMが好ましい。

なお、本明細書において、分化状態とは軟骨細胞が少なくとも以下の(1)～(2)の性質を有することを意味する。

- 20 (1) 球形を呈し、細胞外基質に富む
(2) トルイジンブルーで良好に染色される。

軟骨細胞が軟骨としての分化状態を維持するのに十分な量の膜透過性cAMP類似体は、脱分化した軟骨細胞の分化を誘発することもできる。

- 25 さらに、本発明は、本発明培養方法によって培養された、以下(1)～(3)の性質を有するヒト由来の軟骨細胞も提供する。

(1) 球形を呈し、細胞外基質に富む

(2) トルイジンブルーで良好に染色される

(3) 本発明DNAが発現している。

トルイジンブルーは硫酸化プロテオグリカンを選択的に染色するので、本発明の軟骨細胞は硫酸化プロテオグリカンを合成している。

- 5 この軟骨細胞は、通常には、I型及びII型コラーゲン並びにアグリカンのmRNAを発現している。

実施例

以下、実施例により本発明を説明する。

- 10 (実施例1) 分化状態における軟骨細胞の培養

およそ妊娠25週で自然流産したヒト胎児(Norman Bethune University of Midcal Sciences, the Department of Pathology から入手)の大腿骨膝間接の骨端軟骨を採取した。この軟骨から、細切した軟骨を3mg/mlのコラゲナーゼ(タイプIA、Sigma)を含む α 改変イーグル培地(α -MEM)中で3時間インキュベートすること以外はShimomura et al. (1975) Calcif. Tissue Res. 19, 179-187に記載の方法と同じ方法によって軟骨細胞を単離した。得られた細胞を1×10⁵個/ディッシュの密度でI型コラーゲン被覆ディッシュにまき、10%牛胎仔血清、50 μ g/mlアスコルビン酸、32単位/mlのペニシリン及び40 μ g/mlのストレプトマイシンを含む α -MEM(10ml/ディッシュ)中で培養した。サブコンフルエント(subconfluent)になったところでジブチリルcAMP(dbcAMP)(1mM)を培養培地に添加した。dbcAMPの存在下及び非存在下のいずれかで2日以上培養した後、細胞の形態学的観察を行うとともに、細胞を集め、エタノールで固定した後トルイジンブルーで染色した。

- 25 dbcAMPの存在下で培養した軟骨細胞は球形を呈して、細胞外基質に富んでいたのに対し、非存在下で培養した軟骨細胞は、紡錘形の線維芽細胞様であ

り細胞外基質に乏しかった。図2Aに、dbcAMP添加後6日目の細胞の形態の顕微鏡写真を示す(a: dbcAMP非添加、b: dbcAMP添加)。

また、硫酸化プロテオグリカンを選択的に染色するトルイジンブルーによる染色では、dbcAMP存在下で培養した軟骨細胞は、良好に染色されたが、非存在下で培養した軟骨細胞は、ほとんど染色されなかった。図2Bに、dbcAMP添加後12日目の細胞をトルイジンブルーで染色した結果を示す(a: dbcAMP非添加、b: dbcAMP添加)。

また、分子マーカーとして、I型及びII型コラーゲン並びにアグリカンのmRNAの発現をRT-PCR法にて検討した。分子マーカーの発現をdbcAMP存在下と非存在下で比較した結果、dbcAMP存在下では分化状態が維持されていることが示唆された。

従って、dbcAMP存在下で培養した軟骨細胞は、軟骨としての分化状態を維持している、すなわち分化表現型が維持されていると認められた。

dbcAMPの上記効果の用量依存性を調べたところ、該効果は用量依存的に増大し、0.3~0.5mMで最大になった。

なお、dbcAMPに代えて、ウサギ及びニワトリの軟骨細胞の分化表現型の発現を安定させたり刺激したりすると報告されているbFGF(0.4ng/ml)及びTGF- β (3ng/ml)を用いて上記と同様に軟骨細胞を培養したが、これらによってはヒト由来の軟骨細胞の分化表現型の発現が維持されなかった。

(実施例2) 分化状態の軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子

実施例1に記載されたようにdbcAMPの存在下及び非存在下に培養された軟骨細胞から、グアニジンチオシアネート/セシウムトリフルオロアセテート法により全RNAを抽出した。ポリ(A)+RNAをOligotex-dT30(Roche)を用いて濃縮した。分化軟骨細胞(+dbcAMP)では発現するが、脱分化軟骨細胞(-dbcAMP)では発現しないmRNAが認められるクローンをサブトラク

- ティブハイブリダイゼーション(subtractive hybridization)法により選択した。PCRセレクトcDNAサブトラクションキット(Clontech)を用いて、分化軟骨細胞のmRNA由来のcDNAを、脱分化軟骨細胞のmRNA由来のcDNAの過剰量に対しハイブリダイズさせた。ハイブリダイズしない、すなわち分化状態
- 5 態で発現するcDNAが、製造者の指示書に従って、サプレッションPCRにより増幅された。得られたPCR産物をTテールベクターのpGEM-T (Promega)にクローンし、約120個のクローンの塩基配列決定を行った。更なる分析のために1個のクローン(pSUB37)を選択し、対応するタンパク質産物をDEC1と命名した。
- 10 pSUB37のNcoI-PstIフラグメントをプローブとして用いて、DEC1のmRNAの種々のヒト胎児組織における発現をノザンロットにより調べた結果、DEC1は、軟骨、脾臓、腸及び肺で発現し、また、心臓、肝臓、脳及び胃でも少量ながら発現していた。なお、ノザンロットは以下のようにして行った。全RNA(5又は10 μ g)をホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルで電気泳動し、ハイボンド-Nメンブラン(Amersham)に転写した。組織分布を調べるため、種々のヒト胎児組織の全RNAがNorman Bethune University of Medical SciencesのLi Yu博士より提供された。pSUB37のNcoI-PstIフラグメントを[³²P]dCTPで標識し、ハイブリダイゼーションプローブとして用いた。メンブランを65°Cで30分間、0.5%SDSを含む0.2 \times SSCにより洗
- 15 浄した。洗浄したメンブランにより、-70°Cで増感膜を用いてバイオマックスX線フィルムを感光させた。
- 20

- DEC1 cDNAの全長の塩基配列決定は以下のように行った。DEC1全長cDNAを、マラソン(Marathon)cDNA増幅キット(Clontech)を用いるラビッドアンプリフィケーションcDNAエンド(RACE、rapid amplification cDNA ends)法により単離した。すなわち、二本鎖cDNAをマラソンcDNAアダプターに連結し、サプレッションPCRに付した。反応は、アダプタープライ
- 25

マーと、pSUB37の塩基配列に基づいてDEC1用に設計した遺伝子特異的プライマーとを用いて行った。増幅したcDNA試料を4%ポリアクリルアミドゲルで分離し、主要バンドのDNAをゲルから抽出し、pGEM-Tにサブクローニングした。サブクローニングされたプラスミドの二本鎖DNA及び一連の合成オリゴヌクレオチドを配列決定テンプレート及び特異的プライマーとしてそれぞれ用いた。DNA配列決定は、シークエナーゼ7-デアザ-dGTP DNAシーケンシングキット (Amersham) 又はABIプリズム310オートシーケンサー (Perkin Elmer) を用いて、サンガー法によって行った。

このようにして決定されたDEC1 cDNAの塩基配列とそれから推測されるアミノ酸配列を配列番号1に示す。また、このアミノ酸配列のみを配列番号2に示す。DEC1 cDNAは、1236bpのオープンリーディングフレームを有している。ポリA領域を除いた2922bpの長さは、上記ノザンプロット分析で得られたmRNAのサイズ(3.1kb)によく一致する。5'領域にインフレームとなるストップコドンがあるので、最初のATGが開始コドンと認められる。また、最初のATGコドンの近くの配列はコザック共通配列に合致する(GCCGCCA/GCCATGG)。従って、DEC1は、412アミノ酸から成り、算出分子量は45.5kDaである。

(実施例3)

(1) 材料及び方法:

軟骨細胞は、すでに報告された方法 (Shimomura et al. (1975) *Calcif. Tissue Res.* 19, 179-187) に従い、4週齢の雄日本白ウサギの肋骨の肋骨成長プレートおよび静止軟骨から分離した。

これらの細胞を、 5×10^5 細胞/10mmのプラスチック組織培養皿に播種し、10%FBS、60mg/mlカナマイシン、250ng/mlアンホテリシンBおよび50U/mlペニシリンGを補足した10mlの α -MENの中で、37°Cで、5%CO₂含む空气中に保持した。培養物がコンフルエントになってか

ら、細胞をPBSで洗浄して、血清を含有しない新鮮な10mlの α -MENに移して48時間保持した。インキュベーション終了前の1時間から24時間に、1mMのdbcAMP、或いは 10×10^{-7} Mのヒト組み換えPTH-(1-84)を培地に添加した。

- 5 ヒト胚性肺繊維芽細胞(MRC-5)、ヒト子宮頸上皮細胞(HeLa)、ヒト肝癌細胞(HepG2)及びイヌ腎臓上皮細胞(MDCK)は、理研遺伝子バンク(日本)から入手し、10%FBSを補足したダルベッコ改良イーグル培地(DMEM)の中でコンフルエントになるまで培養した。培養物がコンフルエントになってから、細胞を10%PBSで洗浄して、血清を含有しない新鮮なDMEM
10 に移して48時間保持した。インキュベーション終了前1時間から24時間に、1mMのdbcAMPを培地に添加した。後、細胞をRNA調製のために採取した。

(2) ノーザンブロット分析:

- 全RNAを培養細胞からグアニジン・チオシアネート/トリフルオル酢酸セシウム法(Smale G. and Sasse J., Anal. Biochem. 203, 352-356 (1992))により抽出
15 した。全RNA試料(8-20 μ g)を、ホルムアミドを含む1%アガロースゲル上で電気泳動し、NYTRAN膜(schleicher & schuell, Japan)に移した。pSUB37の1.1kbのNcoI-PstI断片を、 $[^{32}\text{P}]$ dCTPでラベル化し、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。膜は、0.5%DSDを含有する0.2x
20 SSCを用いて、55°Cで、30分間洗浄した。洗浄した膜は、-70°Cで、増感スクリーンを用いてバイオマックス(BioMax) X線フィルム(Eastman Kodak Co., Rochester, NY)に露光した。

(3) 結果:

- (i) ヒト肺由来腺維芽細胞株MRC5においては、dbcAMPの添加後、1-
25 24時間でDEC1 mRNAが誘導された(図3)。
(ii) ヒト子宮癌由来Hela細胞でも、dbcAMPの添加後、1時間以内にDE

C1 mRNAが誘導された(図4)。

(iii) ウサギ軟骨細胞においてPTHの添加後、1-24時間でDEC1 mRNAが誘導された(図5)。

5 (iv) ウサギ軟骨細胞培養系においてもdbcAMPの添加後にDEC1 mRNAが誘導されることを確認した(図6)。

(v) ヒト肝細胞由来細胞株HepG2においては、dbcAMPの添加後、1-6時間ではDEC1 mRNAレベルに変化は見られなかった。

(vi) 腎臓由来細胞株においても、dbcAMPの添加はDEC1 mRNAを誘導した(図7)。

10 以上の結果より、軟骨ではPTH/PTH-rpの作用機構にDEC1 bHLH転写因子が関わっていることが示唆された。さらに、DEC1 bHLH転写因子は検討したほとんどの間葉系および上皮系細胞でcAMPに応答して1時間以内に誘導されたことから、本転写因子はcAMPシグナル系の遺伝子発現にほぼ普遍的に関わっていることが示された。

15

産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明により、分化したヒト由来軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子、並びに、ヒト由来軟骨細胞を分化状態で培養する方法及び該方法で培養されたヒト由来軟骨細胞が提供される。これらは、軟骨の分化や変性のメカニズムを解析する上で重要であるばかりでなく、変形性関節症や慢性関節リウマチなどに対する遺伝子治療の開発にとっても重要である。さらに軟骨細胞以外の多くの細胞においてもcAMPによってDEC1 mRNAが誘導されることから他のcAMP系が関与する病気の治療にも有用であると考えられる。

20

請求の範囲

1. 以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする DNA。
 - (a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質
 - (b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、
5 置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、配列番号 2 におけるアミノ酸番号 51～108 のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号 2 におけるアミノ酸番号 51～108 のアミノ酸配列と 85 % 以上の同一性を有し、
2 量体を形成したときに塩基配列 CANNNTG 及び／又は CACNAG に結合できるタンパク質
- 10 2. 以下の (c) 又は (d) の DNA である請求項 1 記載の DNA。
 - (c) 配列番号 1 に示す塩基配列における塩基番号 207～1442 の塩基配列若しくはその相補塩基配列からなる DNA
 - (d) (c) の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA
- 15 3. 以下の (e) 又は (f) であるタンパク質。
 - (e) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質
 - (f) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、
置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、配列番号 2 におけるアミノ酸番号 51～108 のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号 2 におけるアミノ酸番号 51～108 のアミノ酸配列と 85 % 以上の同一性を有し、
20 2 量体を形成したときに塩基配列 CANNNTG 及び／又は CACNAG に結合できるタンパク質
- 25 4. 請求項 3 に記載のタンパク質に結合し得る抗体。
5. 軟骨細胞が軟骨としての分化状態を維持するのに十分な量の膜透過性 cAMP 類似体の存在下で軟骨細胞を単層培養することを特徴とするヒト由来の軟骨細胞の培養方法。
6. 前記膜透過性 cAMP 類似体がジブチリル cAMP である請求項 5 記載の

培養方法。

7. 請求項 5 又は 6 に記載の培養方法によって培養された、以下 (1) ~ (3) の性質を有するヒト由来の軟骨細胞。

- (1) 球形を呈し、細胞外基質に富む。
- 5 (2) トルイジンブルーで良好に染色される。
- (3) 請求項 1 に記載の DNA が発現している。

図 1

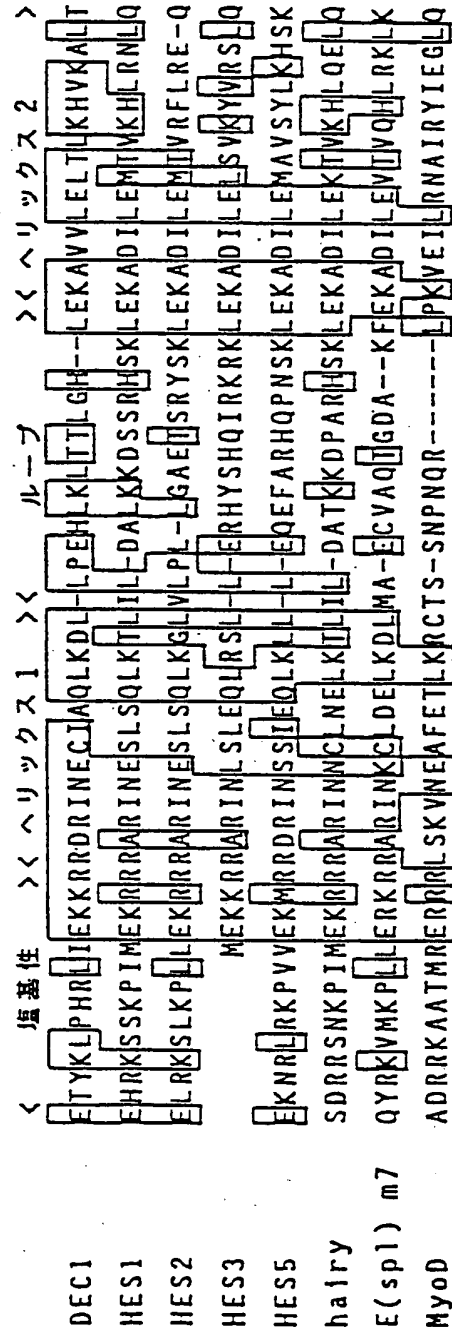


図 2A

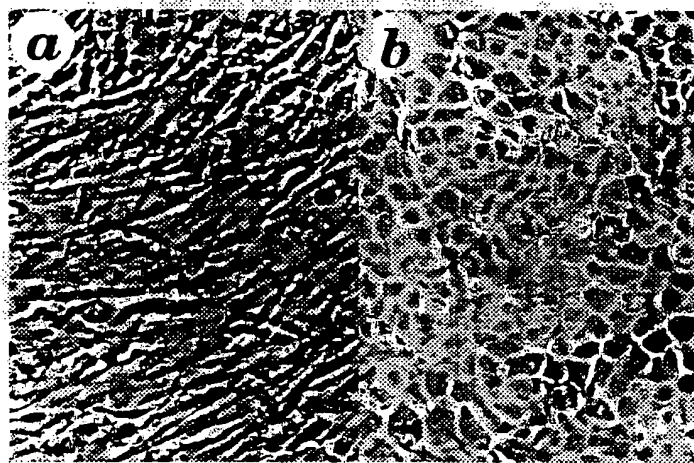


図 2B

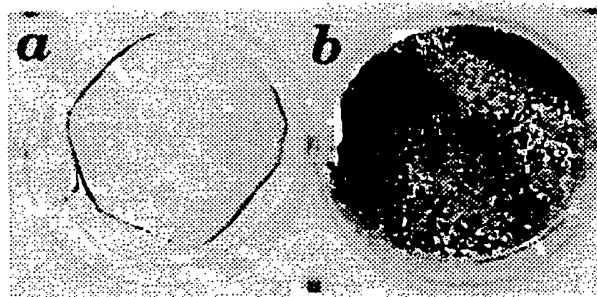


図 3

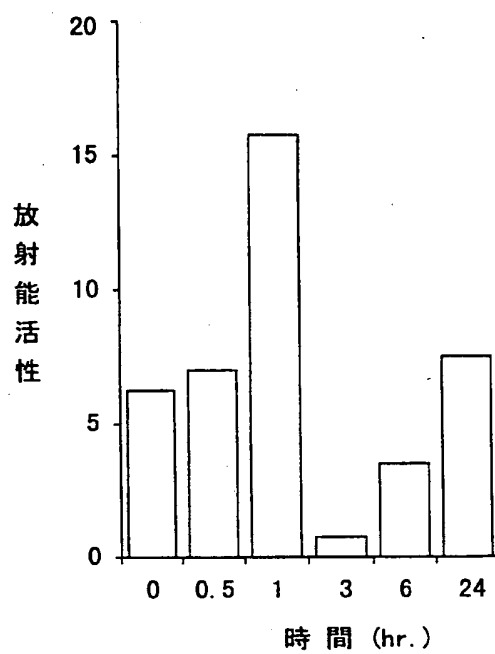


図4

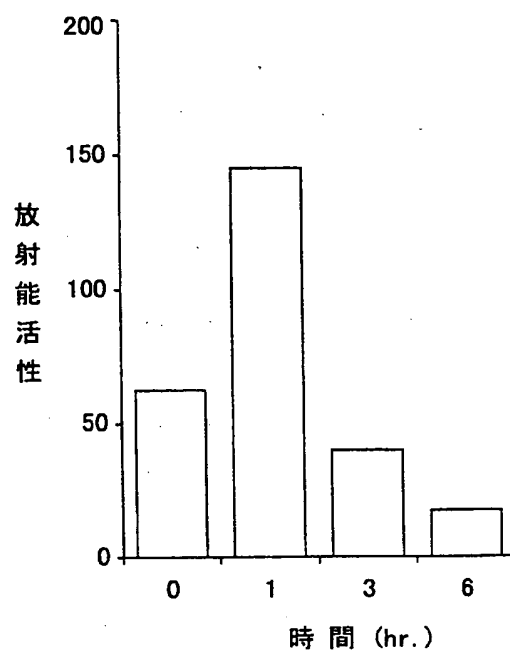


図5

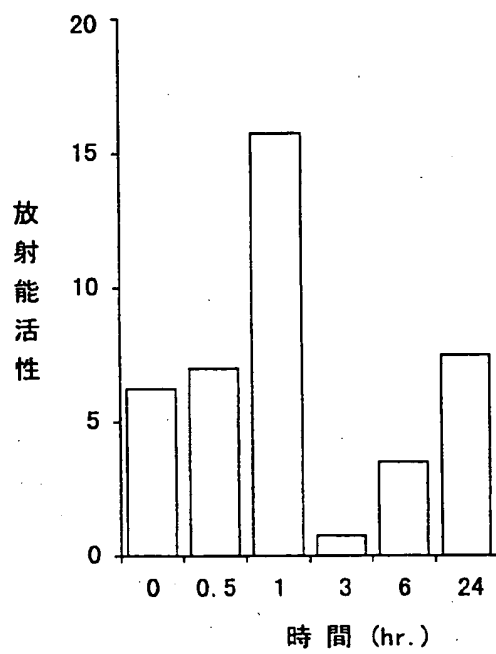


図 6

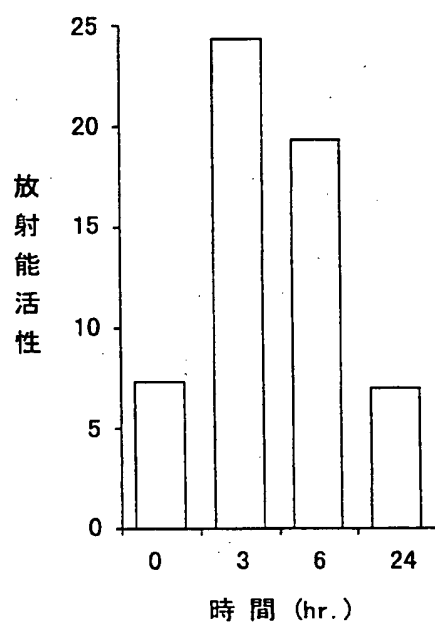
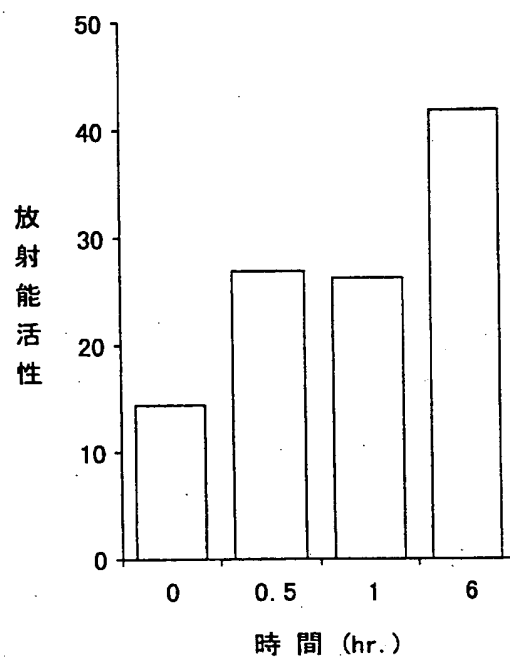


図 7



配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 2948

配列の型 : 核酸

5 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起原

生物名 : ヒト

10 細胞の種類 : 軟骨細胞

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 207..1442

配列

```

15  ATTACGAACT GGACACCGGG CCATGCACGC CCCCAACTGA AGCTGCATCT CAAAGCCGAA    60
    GATTCCAGCA GCCCAGGGGA TTTCAAAGAG CTCAGACTCA GAGGAACATC TGCGGAGAGA    120
    CCCCCGAAGC CCTCTCCAGG GCAGTCCTCA TCCAGACGCT CCGCTAGTGC AGACAGGAGC    180
    GCGCAGTGGC CCCGGCTCGC CGCGCC ATG GAG CGG ATC CCC AGC GCG CAA CCA    233
                                Met Glu Arg Ile Pro Ser Ala Gln Pro

20                                1           5
    CCC CCC GCC TGC CTG CCC AAA GCA CCG GGA CTG GAG CAC GGA GAC CTA    281
    Pro Pro Ala Cys Leu Pro Lys Ala Pro Gly Leu Glu His Gly Asp Leu
    10           15           20           25
    CCA GGG ATG TAC CCT GCC CAC ATG TAC CAA GTG TAC AAG TCA AGA CGG    329
    Pro Gly Met Tyr Pro Ala His Met Tyr Gln Val Tyr Lys Ser Arg Arg
                                30           35           40

```

	GGA ATA AAG CGG AGC GAG GAC AGC AAG GAG ACC TAC AAA TTG CCG CAC	377
	Gly Ile Lys Arg Ser Glu Asp Ser Lys Glu Thr Tyr Lys Leu Pro His	
	45 50 55	
	CGG CTC ATC GAG AAA AAG AGA CGT GAC CGG ATT AAC GAG TGC ATC GCC	425
5	Arg Leu Ile Glu Lys Lys Arg Arg Asp Arg Ile Asn Glu Cys Ile Ala	
	60 65 70	
	CAG CTG AAG GAT CTC CTA CCC GAA CAT CTC AAA CTT ACA ACT TTG GGT	473
	Gln Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu His Leu Lys Leu Thr Thr Leu Gly	
	75 80 85	
10	CAC TTG GAA AAA GCA GTG GTT CTT GAA CTT ACC TTG AAG CAT GTG AAA	521
	His Leu Glu Lys Ala Val Val Leu Glu Leu Thr Leu Lys His Val Lys	
	90 95 100 105	
	GCA CTA ACA AAC CTA ATT GAT CAG CAG CAG CAG AAA ATC ATT GCC CTG	569
	Ala Leu Thr Asn Leu Ile Asp Gln Gln Gln Gln Lys Ile Ile Ala Leu	
15	110 115 120	
	CAG AGT GGT TTA CAA GCT GGT GAG CTG TCA GGG AGA AAT GTC GAA ACA	617
	Gln Ser Gly Leu Gln Ala Gly Glu Leu Ser Gly Arg Asn Val Glu Thr	
	125 130 135	
	GGT CAA GAG ATG TTC TGC TCA GGT TTC CAG ACA TGT GCC CGG GAG GTG	665
20	Gly Gln Glu Met Phe Cys Ser Gly Phe Gln Thr Cys Ala Arg Glu Val	
	140 145 150	
	CTT CAG TAT CTG GCC AAG CAC GAG AAC ACT CGG GAC CTG AAG TCT TCG	713
	Leu Gln Tyr Leu Ala Lys His Glu Asn Thr Arg Asp Leu Lys Ser Ser	
	155 160 165	
25	CAG CTT GTC ACC CAC CTC CAC CGG GTG GTC TCG GAG CTG CTG CAG GGT	761
	Gln Leu Val Thr His Leu His Arg Val Val Ser Glu Leu Leu Gln Gly	

	170	175	180	185	
	GGT ACC TCC AGG AAG CCA TCA GAC CCA GCT CCC AAA GTG ATG GAC TTC	809			
	Gly Thr Ser Arg Lys Pro Ser Asp Pro Ala Pro Lys Val Met Asp Phe				
	190	195	200		
5	AAG GAA AAA CCC AGC TCT CCG GCC AAA GGT TCG GAA GGT CCT GGG AAA	857			
	Lys Glu Lys Pro Ser Ser Pro Ala Lys Gly Ser Glu Gly Pro Gly Lys				
	205	210	215		
	AAC TGC GTG CCA GTC ATC CAG CGG ACT TTC GCT CAC TCG AGT GGG GAG	905			
	Asn Cys Val Pro Val Ile Gln Arg Thr Phe Ala His Ser Ser Gly Glu				
10	220	225	230		
	CAG AGC GGC AGC GAC ACG GAC ACA GAC AGT GGC TAT GGA GGA GAA TCG	953			
	Gln Ser Gly Ser Asp Thr Asp Thr Asp Ser Gly Tyr Gly Gly Glu Ser				
	235	240	245		
	GAG AAG GGC GAC TTG CGC AGT GAG CAG CCG TGC TTC AAA AGT GAC CAC	1001			
15	Glu Lys Gly Asp Leu Arg Ser Glu Gln Pro Cys Phe Lys Ser Asp His				
	250	255	260	265	
	GGA CGC AGG TTC ACG ATG GGA GAA AGG ATC GGC GCA ATT AAG CAA GAG	1049			
	Gly Arg Arg Phe Thr Met Gly Glu Arg Ile Gly Ala Ile Lys Gln Glu				
	270	275	280		
20	TCC GAA GAA CCC CCC ACA AAA AAG AAC CGG ATG CAG CTT TCG GAT GAT	1097			
	Ser Glu Glu Pro Pro Thr Lys Lys Asn Arg Met Gln Leu Ser Asp Asp				
	285	290	295		
	GAA GGC CAT TTC ACT AGC AGT GAC CTG ATC AGC TCC CCG TTC CTG GGC	1145			
	Glu Gly His Phe Thr Ser Ser Asp Leu Ile Ser Ser Pro Phe Leu Gly				
25	300	305	310		
	CCA CAC CCA CAC CAG CCT CCT TTC TGC CTG CCC TTC TAC CTG ATC CCA	1193			

Pro His Pro His Gln Pro Pro Phe Cys Leu Pro Phe Tyr Leu Ile Pro
 315 320 325
 CCT TCA GCG ACT GCC TAC CTG CCC ATG CTG GAG AAG TGC TGG TAT CCC 1241
 Pro Ser Ala Thr Ala Tyr Leu Pro Met Leu Glu Lys Cys Trp Tyr Pro
 5 330 335 340 345
 ACC TCA GTG CCA GTG CTA TAC CCA GGC CTC AAC GCC TCT GCC GCA GCC 1289
 Thr Ser Val Pro Val Leu Tyr Pro Gly Leu Asn Ala Ser Ala Ala Ala
 350 355 360
 CTC TCT AGC TTC ATG AAC CCA GAC AAG ATC TCG GCT CCC TTG CTC ATG 1337
 10 Leu Ser Ser Phe Met Asn Pro Asp Lys Ile Ser Ala Pro Leu Leu Met
 365 370 375
 CCC CAG AGA CTC CCT TCT CCC TTG CCA GCT CAT CCG TCC GTC GAC TCT 1385
 Pro Gln Arg Leu Pro Ser Pro Leu Pro Ala His Pro Ser Val Asp Ser
 380 385 390
 15 TCT GTC TTG CTC CAA GCT CTG AAG CCA ATC CCC CCT TTA AAC TTA GAA 1433
 Ser Val Leu Leu Gln Ala Leu Lys Pro Ile Pro Pro Leu Asn Leu Glu
 395 400 405
 ACC AAA GAC TAAACTCTCT AGGGGATCCT GCTGCTTTGC TTTCCTTCCT 1482
 Thr Lys Asp
 20 410
 CGCTACTTCC TAAAAAGCAA CAAAAAGTT TTTGTGAATG CTGCAAGATT GTTGCATTGT 1542
 GTATACTGAG ATAATCTGAG GCATGGAGAG CAGATTCAGG GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT 1602
 GTGTGTGTGT ATGTGCGTGT GCGTGCACAT GTGTGCCTGC GTGTTGGTAT AGGACTTTAA 1662
 AGTCCTTTT GGCATAGGGA AGTCACGAAG GATTGCTTGA CATCAGGAGA CTTGGGGGGG 1722
 25 ATTGTAGCAG ACGTCTGGGC TTTTCCCCAC CCAGAGAATA GCCCCCTTCG ATACACATCA 1782
 GCTGGATTTT CAAAAGCTTC AAAGTCTTGG TCTGTGAGTC ACTCTTCAGT TTGGGAGCTG 1842

5 GGTCTGTGGC TTTGATCAGA AGGTACTTTC AAAAGAGGGC TTTCCAGGGC TCAGCTCCCA 1902
 ACCAGCTGTT AGGACCCAC CCTTTTGCCT TTATTGTCGA CGTGA CTCAC CAGACGTCGG 1962
 GGAGAGAGAG CAGTCAGACC GAGCTTTCTG CTAACATGGG GAGGTAGCAG GCACTGGCAT 2022
 AGCACGGTAG TGGTTTGGGG AGGTTTCCGC AGGTCTGCTC CCCACCCCTG CCTCGGAAGA 2082
 10 ATAAAGAGAA TG TAGTTCCC TACTCAGGCT TTCGTAGTGA TTAGCTTACT AAGGAACTGA 2142
 AAATGGGCCC CTTGTACAAG CTGAGCTGCC CCGGAGGGAG GGAGGAGTTC CCTGGGCTTC 2202
 TGGCACCTGT TTCTAGGCCT AACCATTAGT ACTTACTGTG CAGGGAACCA AACCAAGGTC 2262
 TGAGAAATGC GGACACCCCG AGCGAGCACC CCAAAGTGCA CAAAGCTGAG TAAAAAGCTG 2322
 CCCCCTTCAA ACAGAACTAG ACTCAGTTTT CAATTCCATC CTAAACTCC TTTTAACCAA 2382
 15 GCTTAGCTTC TCAAAGGCCT AACCAAGCCT TGGCACCGCC AGATCCTTTC TG TAGGCTAA 2442
 TTCCTCTTGC CCAACGGCAT ATGGAGTGTG CTTATTGCTA AAAAGGATTC CGTCTCCTTC 2502
 AAAGAAGTTT TATTTTTGGT CCAGAGTACT TGTTTTCCCG ATGTGTCCAG CCAGCTCCGC 2562
 AGCAGCTTTT CAAGATGCAC TATGCCTGAT TGCTGATCGT GTTTTAACTT TTTCTTTTCC 2622
 TGTTTTTATT TTGGTATTAA GTCGTTGCCT TTATTTGTAA AGCTGTTATA AATATATATT 2682
 20 ATATAAATAT ATTAAAAAGG AAAATGTTTC AGATGTTTAT TTGTATAATT ACTTGATTCA 2742
 CACAGTGAGA AAAAATGAAT GTATTCCTGT TTTTGAAGAG AAGAATAATT TTTTTTCTC 2802
 TAGGGAGAGG TACAGTGTTC ATATTTTGGG GCCTTCCTGA AGGTGTAAAA TTGTAAATAT 2862
 TTTTATCTAT GAGTAAATGT TAAGTAGTTG TTTTAAAAATA CTTAATAAAA TAATTCTTTT 2922
 CCTGTGGAAG AAAAAAAAAA AAAAAA 2948

20

配列番号 : 2

配列の長さ : 412

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

25

配列の種類 : タンパク質

配列

Met Glu Arg Ile Pro Ser Ala Gln Pro Pro Pro Ala Cys Leu Pro Lys
 1 5 10 15
 Ala Pro Gly Leu Glu His Gly Asp Leu Pro Gly Met Tyr Pro Ala His
 20 25 30
 5 Met Tyr Gln Val Tyr Lys Ser Arg Arg Gly Ile Lys Arg Ser Glu Asp
 35 40 45
 Ser Lys Glu Thr Tyr Lys Leu Pro His Arg Leu Ile Glu Lys Lys Arg
 50 55 60
 Arg Asp Arg Ile Asn Glu Cys Ile Ala Gln Leu Lys Asp Leu Leu Pro
 10 65 70 75 80
 Glu His Leu Lys Leu Thr Thr Leu Gly His Leu Glu Lys Ala Val Val
 85 90 95
 Leu Glu Leu Thr Leu Lys His Val Lys Ala Leu Thr Asn Leu Ile Asp
 100 105 110
 15 Gln Gln Gln Gln Lys Ile Ile Ala Leu Gln Ser Gly Leu Gln Ala Gly
 115 120 125
 Glu Leu Ser Gly Arg Asn Val Glu Thr Gly Gln Glu Met Phe Cys Ser
 130 135 140
 Gly Phe Gln Thr Cys Ala Arg Glu Val Leu Gln Tyr Leu Ala Lys His
 20 145 150 155 160
 Glu Asn Thr Arg Asp Leu Lys Ser Ser Gln Leu Val Thr His Leu His
 165 170 175
 Arg Val Val Ser Glu Leu Leu Gln Gly Gly Thr Ser Arg Lys Pro Ser
 180 185 190
 25 Asp Pro Ala Pro Lys Val Met Asp Phe Lys Glu Lys Pro Ser Ser Pro
 195 200 205

Ala Lys Gly Ser Glu Gly Pro Gly Lys Asn Cys Val Pro Val Ile Gln
 210 215 220
 Arg Thr Phe Ala His Ser Ser Gly Glu Gln Ser Gly Ser Asp Thr Asp
 225 230 235 240
 5 Thr Asp Ser Gly Tyr Gly Gly Glu Ser Glu Lys Gly Asp Leu Arg Ser
 245 250 255
 Glu Gln Pro Cys Phe Lys Ser Asp His Gly Arg Arg Phe Thr Met Gly
 260 265 270
 Glu Arg Ile Gly Ala Ile Lys Gln Glu Ser Glu Glu Pro Pro Thr Lys
 10 275 280 285
 Lys Asn Arg Met Gln Leu Ser Asp Asp Glu Gly His Phe Thr Ser Ser
 290 295 300
 Asp Leu Ile Ser Ser Pro Phe Leu Gly Pro His Pro His Gln Pro Pro
 305 310 315 320
 15 Phe Cys Leu Pro Phe Tyr Leu Ile Pro Pro Ser Ala Thr Ala Tyr Leu
 325 330 335
 Pro Met Leu Glu Lys Cys Trp Tyr Pro Thr Ser Val Pro Val Leu Tyr
 340 345 350
 Pro Gly Leu Asn Ala Ser Ala Ala Ala Leu Ser Ser Phe Met Asn Pro
 20 355 360 365
 Asp Lys Ile Ser Ala Pro Leu Leu Met Pro Gln Arg Leu Pro Ser Pro
 370 375 380
 Leu Pro Ala His Pro Ser Val Asp Ser Ser Val Leu Leu Gln Ala Leu
 385 390 395 400
 25 Lys Pro Ile Pro Pro Leu Asn Leu Glu Thr Lys Asp
 405 410

配列番号 : 3

配列の長さ : 4

配列の型 : アミノ酸

5 トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Trp Arg Pro Trp

1

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03106

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12N5/08, C07K14/47, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12N5/08, C07K14/47, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Genbank/EMBL/DDBJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Biochem. Biophys. Res. Commun., 236, (1997), Ming Shen et al., "Molecular characterization of the novel basic helix-loop-helix protein DEC1 expressed in differentiated human embryo chondrocytes" p.294-298	1-7
X	WO, 96-39427, A (Trustees of dartmouth colleg), 12 December, 1996 (12. 12. 96) & EP, 832117, A	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 October, 1998 (28. 10. 98)Date of mailing of the international search report
10 November, 1998 (10. 11. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12P21/02, C12N5/08, C07K14/47, C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12P21/02, C12N5/08, C07K14/47, C07K16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DBJ

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Biochem. Biophys. Res. Commun., 236, (1997), Ming Shen et al. 「Molecular characterization of the novel basic helix-loop-helix protein DEC1 expressed in differentiated human embryo chondrocytes」 p. 294-298	1-7
X	WO, 96-39427, A (Trustees of dartmouth colleg) 12. 12月. 1996 (12. 12. 96) & EP, 832117, A	1-4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 10. 98

国際調査報告の発送日

10.11.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子

4 B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3449